



Deteksi *Channel Catfish* Virus (CCV) – Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)



© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan	2
5 Bahan	3
6 Prosedur	3
7 Interpretasi hasil	5
8 Pelaporan	6
Lampiran A (normatif) Pembuatan media dan pereaksi	7
Lampiran B (informatif) Diagram alur persiapan contoh	8
Lampiran C (informatif) Persiapan contoh uji dari jaringan ikan yang dimatikan.....	9
Lampiran D (informatif) Persiapan contoh uji dari jaringan ikan yang karier/laten	10
Lampiran E (informatif) Komposisi mastermix kontrol internal	11
Bibliografi.....	12
Gambar 1 - Hasil PCR CCV	6
Tabel 1 - Komposisi bahan Amplifikasi CCV	4
Tabel 2 - Komposisi bahan Amplifikasi CCV dengan menggunakan <i>Go Tag Green</i>	4
Tabel 3 - Komposisi bahan Amplifikasi CCV dengan menggunakan <i>PCR beads</i>	5
Tabel E.1 - Komposisi Bahan Amplifikasi CCV	11

Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan memberikan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di Laboratorium acuan dan uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang Deteksi *Channel Catfish Virus* (CCV) – Metode *polymerase chain reaction* (PCR).

Standar ini disusun oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya, dan telah dibahas melalui rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 10 November 2011 di Riau, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian, perguruan tinggi, serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

- 1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan No. PER.19/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.
- 2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
- 3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
- 4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
- 5 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI Nomor: KEP.03/MEN/2010 tentang Daftar Hama Penyakit Ikan Karantina.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 9 April 2012 sampai 8 Juni 2012 dengan hasil akhir RASNI.

Deteksi *Channel Catfish Virus* (CCV) – Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *Channel Catfish Virus* (CCV) dengan menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

2 Istilah dan definisi

2.1

aliquot

tiap bagian yang mempunyai hubungan kuantitatif terhadap keseluruhan atau terhadap bagian lain dari keseluruhan yang sama. contoh plasma atau serum yang diambil untuk menentukan komposisi kuantitatif keseluruhan itu

2.2

amplicon

hasil proses amplifikasi DNA menggunakan *primer* spesifik

2.3

antibodi

molekul *imunoglobulin* yang mempunyai suatu rantai asam amino spesifik, hanya berinteraksi dengan antigen yang menginduksi sintesis molekul ini di dalam sel dari sel *limfoid* (khususnya sel plasma), atau dengan antigen yang erat hubungannya dengan antigen tersebut. Antibodi digolongkan menurut cara kerjanya, seperti *agglutinin*, *bakteriolisin*, *hemolisin*, *opsonin*, *presipitin*, dll

2.4

amplifikasi

pelipatgandaan bagian tertentu dari DNA virus dengan bantuan reaksi enzim *polymerase*

2.5

annealing

proses perlekatan antara *primer* dan *template*

2.6

asam nukleat

bagian dari sel yang membawa informasi genetik kepada keturunannya. asam nukleat yang dibawa virus dapat berupa DNA (asam *deoksiribonukleat*) atau RNA (asam *ribonukleat*)

2.7

carrier (pembawa)

suatu individu yang dalam tubuhnya mengandung organisme spesifik suatu penyakit tanpa menunjukkan gejala-gejala dan mampu membawa infeksi

2.8

***Channel Catfish Virus* (CCV)**

virus penyebab CCVD tergolong pada spesies *Herpesvirus ichtaluri* famili Herpesviridae

2.9

denaturasi

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal

2.10

ekstraksi

proses pemisahan materi genetik virus dari jaringan atau sel

2.11

elektroforesis

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan pada berat molekul

2.12

extention

proses pembentukan DNA baru

2.13

infeksi sistemik

tipe infeksi dari suatu penyakit yang menginfeksi seluruh tubuh

2.14

penyakit viral

penyakit yang disebabkan oleh virus

2.15

preparasi

proses pemisahan organ target dari tubuh ikan

2.16

PCR

suatu metode *in vitro* yang digunakan untuk mensintesis sekuen tertentu DNA dengan menggunakan dua primer oligonukleotida yang menghibridisasi pita yang berlawanan dan mengapit dua target DNA

2.17

template DNA

DNA hasil ekstraksi yang digunakan sebagai cetakan untuk proses amplifikasi

3 Prinsip

Mengisolasi dan memurnikan virus ikan yang digunakan pada kultur kemudian diidentifikasi dengan metoda uji PCR.

4 Peralatan

- a) *autoclave*;
- b) *biopsy punch*/ gunting;
- c) elektroforesis;
- d) *freezer* (suhu -20 °C);
- e) *glassware*;
- f) *genequant*;
- g) kamera/alat dokumentasi;
- h) *microwave/ hot plate magnetic stirrer*;
- i) mikrosentrifus *refrigerated*;

- j) mikropipet ukuran 0,2 µl-2 µl; 1µl-10 µl; 10 µl-100 µl; 20 µl-200 µl; 100 µl-1 000 µl
- k) *minimixer / vortex mixer*;
- l) *minispin*;
- m) *pellet pestle* atau *tissue ruptor* ;
- n) peralatan bedah, terdiri dari: *pinset*, gunting, dan *scalpel*;
- o) *thermal cyclor*;
- p) timbangan analitik sensitivity 0,1 mg;
- q) *uv transilluminator*;
- r) *waterbath/heating block/ incubator/ thermo block*.

5 Bahan

- a) *agarose*;
- b) *akuabides*.
- c) alkohol absolut (C_2H_5OH);
- d) *buffer TE* (100 mM *Tris-HCl*, 10 mM *EDTA*);
- e) *etidium bromide* ($C_{21}H_{20}N_3Br$) (10 mg/ml)/ *SyBR green/ SyBR safe*;
- f) formula PCR:
 - 10 x *PCR buffer*;
 - $MgSO_4$ (25 mM);
 - *dNTPmix* (10 mM);
 - *taq DNA polymerase* (5 unit).
- g) kit komersial untuk ekstraksi DNA;
- h) kontrol positif (ikan yang terinfeksi CCV);
- i) *marker* (100 bp *DNA ladder*);
- a) mikrotip ukuran 10 µl; 200 µl; 1000 µl;
- j) mikrotube ukuran 200 µl; 500 µl; 1500 µl; 2000 µl ;
- k) primer deteksi CCV :
 - Forward : TCA-TCC-GAA-TCC-GAC-AAC-TGA
 - Reverse : CGT-TTC-TCC-GCG-ATC-TTG-G;
- l) Primer kontrol internal :
 - Forward :TCA-TCC-GAA-TCC-GAC-AAC-TGA
 - Reverse : CCA-AGA-TCG-CGG-AGA-AAC.
- m) *proteinase K* (10 mg/ml);
- n) 0,5 x *buffer TBE* (*Tris Boric ethylenediaminetetra acetic acid* 45 mM *tris boric* dan 1 mM *ethylenediaminetetra acetic acid*);
- o) 6 x *loading dye* mengandung pewarna *bromphenol blue*.

CATATAN Pembuatan media dan pereaksi diuraikan dalam Lampiran A.

6 Prosedur

6.1 Persiapan contoh uji dari kultur sel

- a) Ambil 0,5 ml - 1 ml hasil panen kultur sel yang terinfeksi (CPE positif) dari beberapa sumuran kemudian masukkan ke dalam 1,5 ml mikrotube.
- b) Sentrifugasi dengan kecepatan 13 000 rpm – 14 000 rpm selama 30 menit.
- c) Buang supernatan dan larutkan kembali *pellet* tersebut dengan 10 µl *buffer proteinase K*.
- d) Inkubasi pada 55 °C selama 1 jam.
- e) Panaskan pada suhu 95 °C selama 10 menit.
- f) Sentrifugasi pada kecepatan 13 000 rpm – 14 000 rpm selama 10 detik.

- g) Buang supernatan dan keringanginkan *pellet* pada suhu 25 °C – 30 °C selama 5 menit – 10 menit.
- h) Larutkan *pellet* dengan 100 µl akuabides.
- i) Gunakan 3 µl DNA hasil ekstraksi untuk setiap reaksi PCR.

CATATAN Ekstraksi DNA juga dapat menggunakan metoda standar lainnya

6.2 Persiapan contoh uji dari jaringan

6.2.1 Persiapan contoh uji dari jaringan ikan yang dimatikan

- a) buat filtrat dari batang ginjal ikan yang sudah dimatikan.
- b) homogenisasi (digerus), buat larutan pengenceran 1/10.
- c) ambil sebanyak 10 mg ke dalam mikrotube 1,5 ml.
- d) sentrifugasi dengan kecepatan 8 000 rpm selama 10 menit.
- e) untuk ikan yang terinfeksi, filtrat ini dapat digunakan sebagai template, dengan mengambil sebanyak 3 µl supernatan.

6.2.2 Persiapan contoh uji dari jaringan ikan yang karier/ laten

- a) lakukan biopsi pada sirip ekor dengan menggunakan gunting */biopsy punch* berdiameter 6 mm
- b) buat ekstraksi menggunakan kit komersial biasa
- c) Ukur kemurnian dengan menggunakan genequant sampai mendapatkan rasio OD 1,6 - 2,0 pada 260nm / 280 nm atau hasil ekstraksi dielektroforesis untuk melihat kualitas tampilan band yang dihasilkan.
- d) Gunakan sebanyak 0,5 µg DNA sebagai template

6.3 Persiapan PCR

- a) Buat *Mastermix* tiap contoh seperti pada tabel 1 atau tabel 2 atau tabel 3

Tabel 1 - Komposisi bahan Amplifikasi CCV

Komposisi	Volume (µl)
<i>Distilled water</i> (dH ₂ O)	33,9
10x <i>Buffer</i>	5,0
<i>Forward primer</i> deteksi CCV (50 pmole/ µl)	0,4
<i>Reverse primer</i> deteksi CCV (50 pmole/ µl)	0,4
dNTPs (2,5 mM tiap basa)	2,0
Tag Polymerase (5U/ µl)	0,3
25 mM MgSO ₄	5,0
DNA Template	3,0

Tabel 2 - Komposisi bahan Amplifikasi CCV dengan menggunakan Go Tag Green

Komposisi	Volume (µl)
<i>Distilled water</i> (dH ₂ O)	21,2
2 x Go Tag Green	25,0
<i>Forward primer</i> deteksi CCV (50 pmole/ µl)	0,4
<i>Reverse primer</i> deteksi CCV (50 pmole/ µl)	0,4
DNA Template	3,0

Tabel 3 - Komposisi bahan Amplifikasi CCV dengan menggunakan PCR beads

Komposisi	Volume (µl)
Distilled water (dH ₂ O)	46,2
PCR beads	1 butir
Forward primer deteksi CCV (50 pmole/ µl)	0,4
Reverse primer deteksi CCV (50 pmole/ µl)	0,4
DNA Template	3,0

- b) Buat 2 buah kontrol negatif (berisi primer deteksi CCV ditambah dH₂O sebagai template dan primer kontrol internal ditambah dH₂O sebagai template); satu buah kontrol positif; sampel sesuai kebutuhan.
- c) Inkubasikan reaksi diatas pada *thermal cycler* dengan siklus :

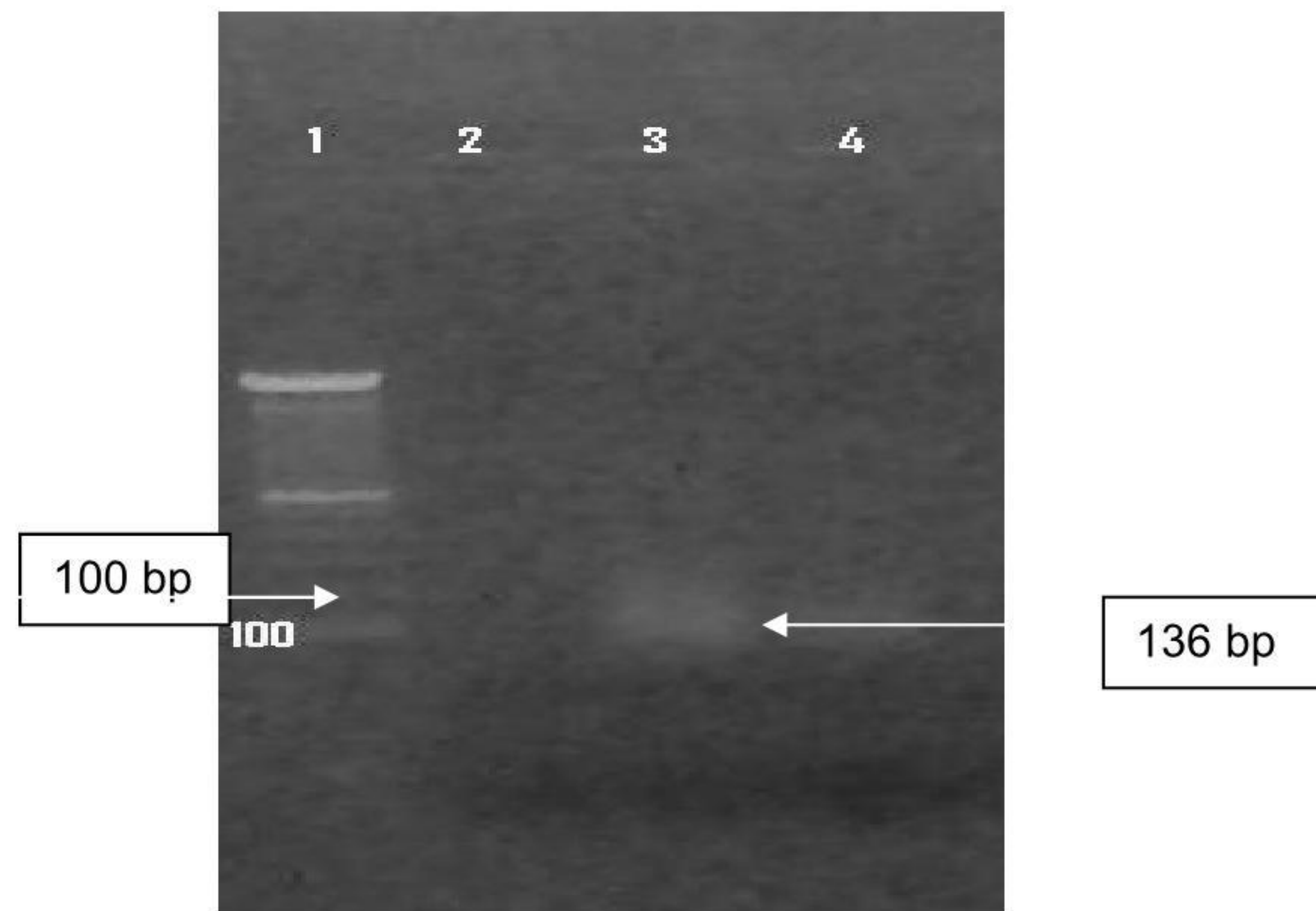
Tabel 4 – Pengaturan suhu dan siklus

Suhu (°C)	Waktu (detik)	Siklus (kali)
93	30 detik	
60	30 detik	
72	30 detik	30
4		1

- d) Elektroforesis 10 µl produk PCR (*amplicon*) dan *marker* 100 base pair (bp) pada agarose 1,5% yang telah ditambah *sybersafe* 4 µl
- e) Amati hasil elektroforesis dan foto di bawah UV *transillumination*.

7 Interpretasi hasil

- a) Internal kontrol menghasilkan produk PCR berukuran 149 bp;
- b) kontrol negatif (*blanko/ ddH₂O*): tidak terlihat adanya pita berukuran 136 bp;
- c) kontrol negatif (DNA negatif CCV) : tidak terlihat adanya pita berukuran 136 bp;
- d) kontrol positif (DNA CCV): terlihat adanya pita berukuran 136 bp;
- e) Jika tidak ada kedua *band* maka reaksi PCR tidak bereaksi disebabkan oleh kegagalan adanya satu komponen PCR atau zat yang menghambat (*inhibitor*) pada contoh.
- f) Jika kontrol negatif menghasilkan 136 bp berarti terjadi adanya kontaminasi pada saat persiapan contoh dan pengujian harus diulang kembali.
- g) Jika dihasilkan *band* yang tidak sesuai dengan hasil PCR untuk CCV maka PCR dapat diulangi tanpa menggunakan internal standar dan *band* yang dihasilkan dapat langsung *disequens*.



Tabel 5 – Interpretasi hasil

Kolom	Isi	Hasil
1	Marka DNA 100 bp	-
2	Kontrol Negatif	Negatif
3	Sampel 1	Positif
4	Sampel 2	Positif

Keterangan :

1. Primer CCVD OIE;
2. Sampel positif pada 136 bp.

Gambar 1 - Hasil PCR CCV

8 Pelaporan

Contoh dinyatakan menderita CCV jika terjadi *cytophatic effect* (CPE) pada kultur *Chanel Catfish Ovary* (CCO) dan positif pada hasil deteksi PCR.

Lampiran A (normatif) Pembuatan media dan pereaksi

A.1 *Phosphate Buffered Saline (PBS)*

Bahan:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Akuades	800 ml

Cara membuat:

- a) Larutkan semua bahan diatas kemudian sesuaikan pH.
- b) Aduk hingga semua bahan larut.
- c) Tambahkan akuades sampai 1 000 ml.

A.2 *Buffer 10 x tris (0.5 M)*

Cara membuat:

- a) Campur *tris* base (60.57 g/l), *sodium chloride* (89 g – 90 g), dan *hydrochloric acid* (30 ml).
- b) Sesuaikan pH 7.8.
- c) Encerkan 10 x saat akan digunakan.

A.3 *PBST (Phosphat Buffered Saline-Tween)*

Cara membuat:

Campur 0.01 M PBS pH 7,2 dengan 0.05 % *tween* 80.

A.4 *Buffer proteinase K*

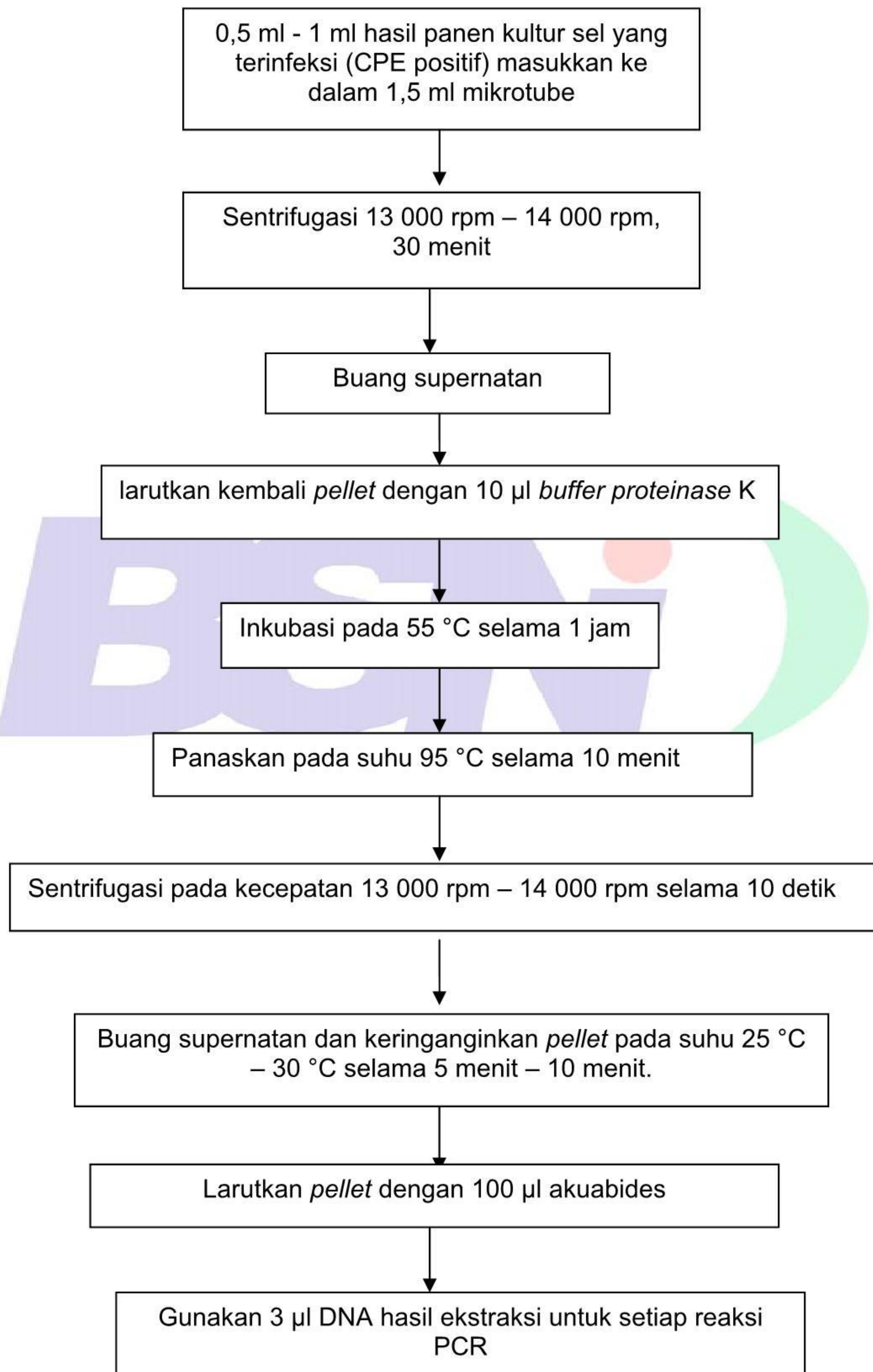
Cara membuat:

- a) Campurkan 50 mM KCL, 15 mM *tris*-HCl pH 8.3 dan 0,5 % *nonidet* P-40.
- b) Tambahkan 0,5 mg *proteinase* K untuk setiap ml campuran di atas.

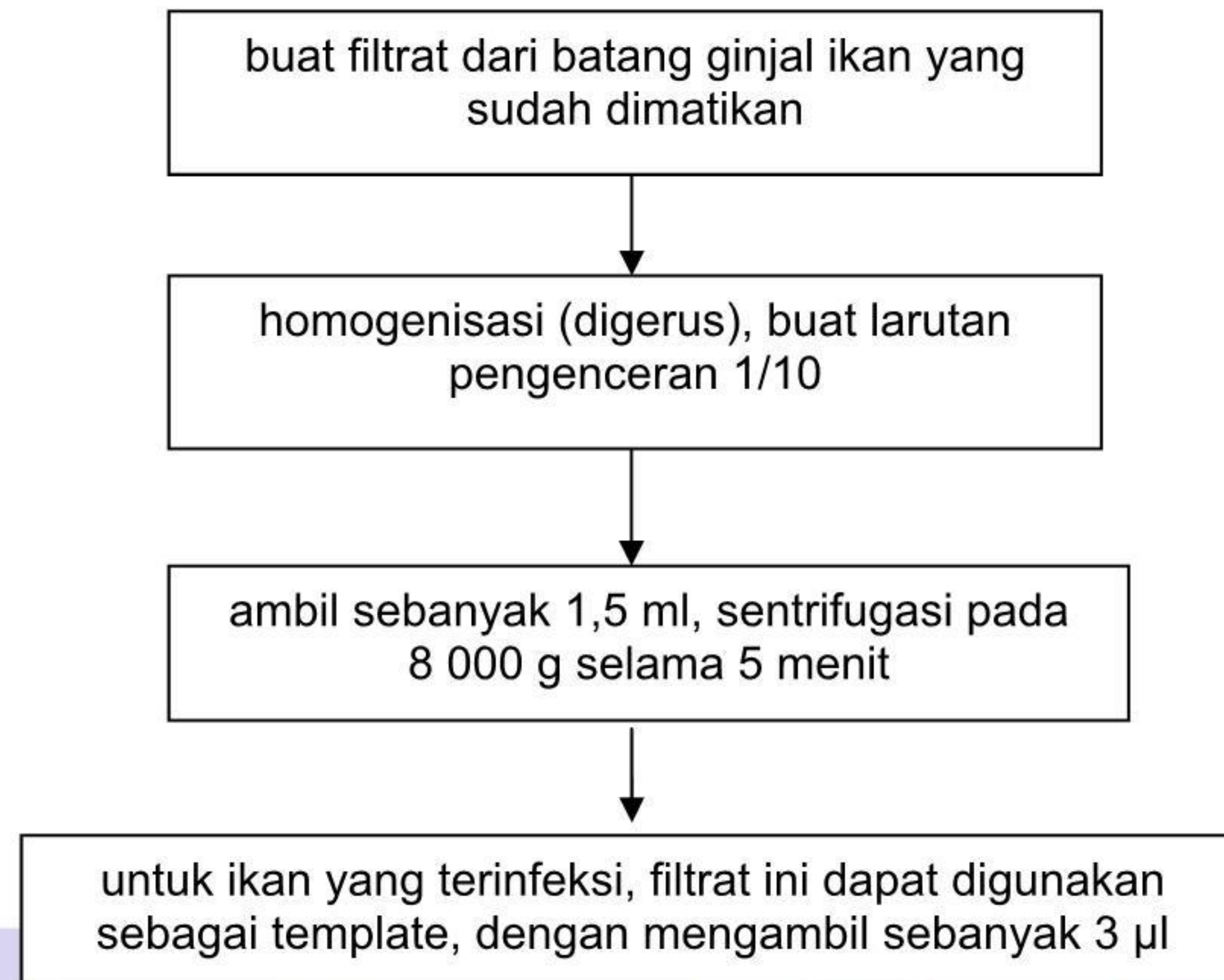
A.5 *SDS 10%*

Untuk membuat larutan 100 ml 10% SDS, larutkan 10 g SDS kedalam 100 ml air Mili Q (air yang dipurifikasi).

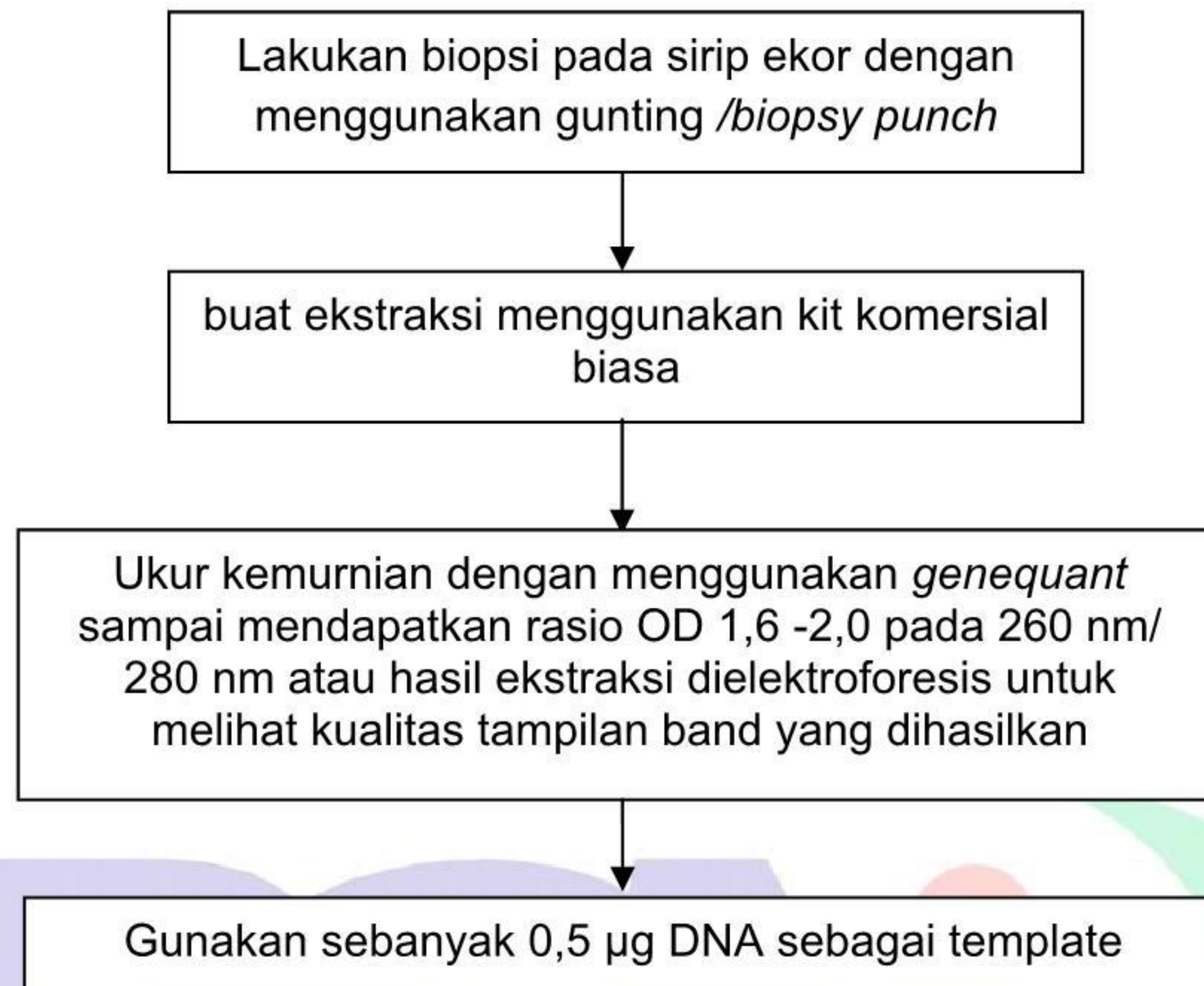
Lampiran B
(informatif)
Diagram alur persiapan contoh



Lampiran C
(informatif)
Persiapan contoh uji dari jaringan ikan yang dimatikan



Lampiran D
(informatif)
Persiapan contoh uji dari jaringan ikan yang karier/laten



Lampiran E
(informatif)
Komposisi mastermix kontrol internal

Tabel E.1 - Komposisi Bahan Amplifikasi CCV

Komposisi	Volume (µl)
<i>Distilled water</i> (dH ₂ O)	34,9
10x <i>Buffer</i>	5,0
<i>Forward primer</i> kontrol internal (50 pmole/ µl)	0,4
<i>Reverse primer</i> kontrol internal (50 pmole/ µl)	0,4
dNTPs (2,5 mM tiap basa)	2,0
Tag Polymerase (5U/ µl)	0,3
25 mM MgSO ₄	5,0
DNA Template	2,0



Bibliografi

Australian Government, 2004. *Disease of Finfish, Viral diseases- Channel catfish virus diseases*. Departement of Agriculture, Fisheries and Forestry (www.disease-watch.com)

Erllich HA. 1989. *PCR Technology Principles And Application For DNA Amplification*. New York: M Stockton Press

Metode standar pemeriksaan Hama dan Penyakit Ikan Karantina golongan virus.

OIE, 2006. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Animal*, Office des International des Epizooties (OIE) chapter 2.6.1.

